



REC'D 06 DEC 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

IB/04/3882

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

25 NOV. 2004

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

<p>REMISE DES PIÈCES</p> <p>DATE 12 NOV 2003</p> <p>LIEU 75 INPI PARIS B</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT 0313261</p> <p>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</p> <p>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 12 NOV. 2003</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE</p>
<p>Vos références pour ce dossier (facultatif) 240280 D20884 SDE</p>	

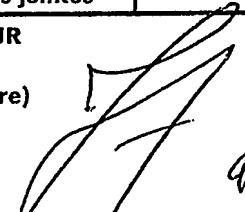
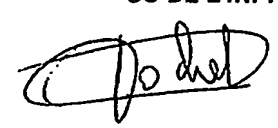
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie</p>	<p><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p>
<p>2 NATURE DE LA DEMANDE</p> <p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/></p> <p>Demande divisionnaire <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;"><i>Demande de brevet initiale</i></p> <p style="text-align: center;"><i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i></p> <p>Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/></p>	<p>Cochez l'une des 4 cases suivantes</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>N° _____ Date _____</p> <p>N° _____ Date _____</p> <p>N° _____ Date _____</p>

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

UTILISATION DE LIPOPEPTIDES POUR ACTIVER DES LYMPHOCYTES T A TRAVERS LA PEAU

<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>	<p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date _____</p> <p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date _____</p> <p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date _____</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>
---	---

<p>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</p> <p>Nom ou dénomination sociale _____</p> <p>Prénoms _____</p> <p>Forme juridique _____</p> <p>N° SIREN _____</p> <p>Code APE-NAF _____</p> <p>Domicile ou siège _____</p> <p>Nationalité _____</p> <p>N° de téléphone (facultatif) _____</p> <p>Adresse électronique (facultatif) _____</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique</p> <p>TXCELL</p> <p>SOCIETE PAR ACTIONS SIMPLIFIEE</p> <p>435361209</p> <p>route de Saint Antoine de Ginestière, Bâtiment Arc Hôpital de l'Arche, 06200 NICE</p> <p>FRANCE</p> <p>Française</p> <p>N° de télécopie (facultatif) _____</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>
--	---

Réservé à l'INPI EMISE DES PIÈCES DATE 12 NOV 2003 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0313261 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 W / 030103	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom _____ Prénom _____ Cabinet ou Société _____ N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel _____ Adresse Rue _____ Code postal et ville _____ Pays _____ N° de téléphone (facultatif) _____ N° de télécopie (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____		240280 SDE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [] [] [] []	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
 12.11.2003 J. WARCOIN 971253			

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'un lipopeptide ou d'un de ses mélanges, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique couplé de manière covalente à un radical lipidique, pour la fabrication d'un médicament topique destiné à activer les lymphocytes T, ledit antigène étant spécifique des lymphocytes T. Une telle utilisation est plus particulièrement destinée à une application transcutanée du médicament topique, lequel est avantageusement destiné à prévenir ou à traiter une maladie de la peau. L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques ou cosmétiques comprenant le lipopeptide selon l'invention.

10 On souhaite pouvoir trouver un moyen d'induire une réponse immunitaire à travers la peau, en particulier on souhaite activer les lymphocytes T, soit en vue d'activer les mécanismes de défense, soit en vue de réguler une réponse immunitaire médiée.

15 La nécessité d'induire une telle réponse immunitaire est notamment justifiée dans de nombreuses maladies de la peau, comme le psoriasis, le vitiligo, le prurigo, le pityriasis, la mastocytose cutanée éruptive, les sclérodermies, les dermatoses bulleuses, les emphysèmes cutanés, l'eczéma ou l'acnée.

20 Parallèlement, il peut être nécessaire de réguler la réponse immunitaire lors de réactions inflammatoires cutanées, comme par exemple en cas d'œdèmes, de rejet de greffe, ou bien suite à une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, ou due à un allergène ou à un microbe.

25 On connaît actuellement des applications topiques de protéines ou de peptides capables d'induire une immunisation transcutanée, mais ces méthodes sont d'une part peu efficaces, et d'autre part les peptides utilisés peuvent présenter des risques pour la santé humaine (Glenn et al, Nature, Vol.391, 26 février 1998, p.851 ; Glenn et al, Nat Med. 2000 Dec;6(12):1403-6 ; Hammond et al, Vaccine. 2001 Mar 21;19(17-19):2701-30 7).

De manière indépendante, les lipopeptides, constitués d'un composé peptidique lié de manière covalente à une partie lipophile de nature non peptidique, sont bien connus de l'homme de l'art. Ils ont initialement été mis au point pour résoudre le problème de l'entrée de substances dotées de propriétés pharmacologiques. En effet, les peptides synthétiques et les oligonucléotides traversent difficilement la membrane cellulaire. Une approche intéressante pour améliorer leur capacité à pénétrer dans la cellule est de les modifier par une partie lipophile.

10

Les inventeurs ont découvert de manière tout à fait surprenante que l'administration topique sur la peau de lipopeptides comprenant un peptide antigénique étaient capables d'activer les lymphocytes T localement, et ceci de manière très efficace et sans risques pour la santé.

15

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un lipopeptide ou d'un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique couplé de manière covalente à un radical lipidique pour la fabrication d'un médicament topique destiné à activer les lymphocytes T, ledit antigène étant spécifique des lymphocytes T.

20

Au sens de la présente invention, on entend désigner par antigène peptidique spécifique des lymphocytes T un antigène de nature peptidique qui, lorsqu'il est couplé de manière covalente à un radical lipidique, est capable d'activer les lymphocytes T notamment à travers la peau.

25

De préférence, l'antigène de nature peptidique contient au moins 6, de préférence au moins 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou au moins 400 acides aminés.

30

De manière encore préférée, lesdits lymphocytes T ont préalablement été sensibilisés à un tel antigène peptidique, et sont capables de les reconnaître lors d'administrations ultérieures.

- 5 Les termes « peptide », « protéine », « polypeptide » et les expressions comme « antigène peptidique » sont utilisés de manière indifférente dans la présente demande pour désigner un enchaînement de plusieurs acides aminés.

- 10 Le couplage covalent entre le radical lipidique et l'antigène peptidique peut être réalisé selon différentes méthodes connues de l'homme du métier. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter, le couplage entre un acide gras et un peptide en phase solide, comme décrit notamment par K. THIAM et al. dans *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 253,639-647, le couplage en solution d'une protéine à un groupement palmitoyl-coenzyme A, ce dernier étant introduit au
15 niveau du groupement thiol d'une cystéine, la ligation chimique, qui permet de lier, en solution et dans des conditions extrêmement douces, deux structures peptidiques préalablement purifiées et totalement déprotégées, comme par exemple le lien disulfure.

- 20 W. ZENG et al. (*J. Pept. Sc.*, 1996,2,66-72) ont également proposé de lier, en solution, un peptide totalement déprotégé et préalablement purifié à une structure lipidique polyfonctionnelle liée à un peptide, et ce par le biais d'un lien oxime. La partie lipophile est introduite sur une séquence peptidique en phase solide.

- 25 De façon similaire, O. MELNYK et al. (*J. Peptide Res.*, 1998,52, 180-184) ont décrit la ligation, en solution et par un lien hydrazone, entre un peptide portant une chaîne lipophile et une fonction aldéhyde et un autre peptide modifié au niveau de la chaîne latérale de lysine par un groupement hydrazino. Le lien hydrazone est réalisé en solution, et le composé lipophile, de nature peptidique, est synthétisé en phase solide.

30

Par ailleurs, C. KLINGUER et al. (*Tetrahedron Letters*, 1996,37,n 40,7259-7262) ont décrit la ligation, dans un mélange eau/acétonitrile et par un lien hydrazone, entre un peptide portant une fonction hydrazine et le cyclohexanecarboxaldéhyde.

Le couplage covalent peut également consister en la création d'un lien hydrazide entre le peptide et le composé qui lui est couplé, lors d'une synthèse convergente en solution. Le procédé mis en œuvre est décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 01/14408 et dans D. BONNET et al. (Tetrahedron Letters, 2000,41 45-48).

Le couplage entre le peptide et le composé lipidique, réalisé en solution, peut également consister la création d'un lien hydrazide, comme décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 02/20558.

De préférence, l'utilisation du lipopeptide selon l'invention est caractérisée en ce que le radical lipidique du lipopeptide est dérivé d'un acide gras. Comme exemples d'acides gras, on peut citer, mais sans s'y limiter, l'acide palmitique, l'acide stéarique l'acide oléique ou l'acide linoléique. De manière encore préférée, l'acide gras est l'acide palmitique.

Pour activer les lymphocytes T, il est possible d'administrer soit un seul type de lipopeptide selon l'invention, soit plusieurs types, lesdits types variant en fonction du radical lipidique et de l'antigène peptidique qui y est couplé.

Selon un autre mode de réalisation, l'utilisation du lipopeptide selon la présente invention est caractérisée en ce que le médicament topique comprend en outre un support pharmaceutiquement acceptable.

Le médicament topique peut également comprendre de manière additionnelle un ou plusieurs adjuvants de l'immunité tels que par exemple l'adjuvant de Freund.

Selon encore un autre mode de réalisation, le médicament topique selon l'invention peut convenir pour une application transmucoale.

Selon encore un mode de réalisation préféré, l'utilisation du lipopeptide selon la présente invention est caractérisée en ce que le médicament topique convient pour une application transcutanée.

5 De manière préférée, l'utilisation du lipopeptide selon la présente invention est caractérisée en ce que l'activation des lymphocytes T est destinée à prévenir ou à traiter une maladie de la peau.

10 De manière encore préférée, l'utilisation du lipopeptide selon la présente invention est caractérisée en ce que la maladie de la peau est choisie dans le groupe du psoriasis, du vitiligo, du prurigo, du pityriasis, de la mastocytose cutanée éruptive, des sclérodermies, des dermatoses bulleuses, des emphysèmes cutanés, de l'eczéma, de l'acnée, d'un œdème ou du rejet de greffe.

15 Les lymphocytes T activés selon la présente invention peuvent être de types divers, comme par exemple les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes T CD4+, également dénommés lymphocytes T auxiliaires (T helpers), ou les lymphocytes Tr1 régulateurs, qui semblent être une catégorie particulière de lymphocytes T CD4+ (Chen et al, 1994, Science 265, 1237-1240 ; Groux et al., 1997, Nature 389, 737-742 ; Mc
20 Guirck et al, 2002, J Exp Med 195, 221-231 ; Powrie et al, 1994, J Exp Med 179, 589-600).

De préférence, l'utilisation du lipopeptide selon l'invention est caractérisée en ce que les lymphocytes T activés sont des lymphocytes T régulateurs.

25

Ainsi, par exemple, lorsque l'antigène peptidique du lipopeptide selon l'invention administré sera spécifique des lymphocytes Tr1, ces derniers seront capables de le reconnaître et seront activés. Ils pourront alors exercer leur action anti-inflammatoire.

30

De tels lipopeptides pourront être administrés localement au niveau de sites où a lieu une réaction inflammatoire locale cutanée, qui peut résulter par exemple d'une

agression extérieure telle que notamment une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, une greffe, ou dûe à un allergène ou à un microbe.

5 Selon encore un autre mode de réalisation, l'utilisation du lipopeptide selon l'invention convient pour la prévention ou le traitement des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau et/ou des muqueuses.

10 De préférence, l'utilisation du lipopeptide selon l'invention est caractérisée en ce que le médicament topique est destiné à être administré au niveau du site de l'inflammation.

De manière encore préférée, l'utilisation du lipopeptide selon la présente invention est caractérisée en ce que le médicament topique est destiné au traitement des maladies auto-immunes ou des maladies inflammatoires chroniques.

15

Le médicament topique selon l'invention peut se présenter sous différentes formes appropriées pour l'administration du lipopeptide ou d'un de ses mélanges. De préférence, l'utilisation du lipopeptide selon l'invention est caractérisée en ce que le médicament topique se présente sous forme de gel, d'émulsion, de crème, de pommade, de lait, d'huile, de lotion, d'aérospray, de patch ou de collyre.

20

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant le lipopeptide selon la présente invention et un support pharmaceutiquement acceptable pour diminuer une réaction inflammatoire locale.

25

Selon un mode de réalisation préféré, la composition pharmaceutique selon l'invention est caractérisée en ce que la réaction inflammatoire locale est une réaction inflammatoire locale cutanée résultant d'une agression extérieure telle que notamment une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, une greffe, ou dûe à un allergène ou à un microbe.

30

Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet une composition cosmétique comprenant le lipopeptide selon l'invention et un support cosmétiquement acceptable pour prévenir ou traiter des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.

5

Ladite composition cosmétique est utilisée avantageusement pour prévenir toute dérive pathologique auto-immune pouvant résulter du vieillissement naturel de la peau.

10 Ladite composition cosmétique est également utilisée avantageusement pour retarder le vieillissement accéléré de la peau soumise aux agressions extérieures, notamment pour prévenir le vieillissement photo-induit de la peau.

15 Le milieu extérieur agresse en permanence la peau, que ce soit via un rayonnement ultraviolet ou via le rayonnement émis par les lampes à décharge ou les divers antigènes atmosphériques naturels ou existants du fait de l'activité humaine, la pollution urbaine, etc., ce qui engage des processus biologiques d'accélération du vieillissement naturel. Le système anti-inflammatoire est ainsi en action de manière permanente, ce qui entraîne une accélération du renouvellement des kératinocytes de la peau, voire une hyperprolifération, aggravant l'entropie du tissu par une surexpression de protéines spécifiques et à terme une déperdition de fonctionnalité. La conséquence en est un renouvellement épuisant des réserves naturelles de kératinocytes et l'entraînement d'un vieillissement prématuré de la peau. La composition cosmétique selon l'invention permet avantageusement d'inhiber les désordres inflammatoires et ainsi de prévenir le vieillissement de la peau. La composition cosmétique selon 25 l'invention se présente avantageusement sous forme solide, pâteuse, ou liquide.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinées à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

30

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Les cellules Tr1 accélèrent la rémission de l'inflammation de la peau médiée par un haptène.

Les lipopeptides activent les lymphocytes T *in vivo*. Des splénocytes transgéniques 20×10^6 DO11-10 TCR-anti OVA ont été injectés en intraveineuse à des souris BALB/c. Les souris ont ensuite été traitées pendant 4 jours en appliquant chaque jour 20 μ l de 50 μ M d'OVA₃₂₃₋₃₃₉-lipopeptide ou de véhicule directement sur une oreille. Au cinquième jour, les souris ont été sacrifiées, les cellules des ganglions lymphatiques de drainage et les cellules des ganglions contra-latéraux ont été colorées avec l'anti-idiotype KJ1-26 capable de reconnaître spécifiquement les lymphocytes T DO11-10, les anticorps anti-CD25 et anti-CD4. L'analyse FACS est montrée pour les cellules des ganglions lymphatiques portée sur les lymphocytes T CD4⁺.

Figure 2 : Les souris BALB/c ont été traitées avec l'haptène Oxazolone (1mg/oreille) aux jours 0, 1 et 2. Au jour 3, toutes les souris ont reçu en intrapéritonéale un million de cellules des populations de cellules T Tr1, Th1 ou Th2 ou du clone Tr1 (A-10-9). Les souris ont ensuite été traitées pendant 6 jours en appliquant chaque jour 20 μ l de 50 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉-lipopeptide (□) ou de véhicule (■) directement sur l'oreille inflammée. Les résultats sont montrés au moyen \pm SD de l'épaisseur des oreilles inflammées d'une expérience représentative sur deux réalisées.

EXEMPLES

Exemple 1 : Matériel et méthodes

Souris

Les souris BALB/c exemptes de pathogènes spécifiques ont été obtenues au CERJ (Le Genest Saint Isle, France). Les souris DO11-10 homozygotes ont été données par le docteur S.D. Hurst (DNAX research Institute, Palo Alto, CA).

Anticorps, milieux et réactifs

Le milieu utilisé pour les cultures de cellules Tr1 est le milieu Yssel (J Immunol Methods. 1984 Aug 3;72(1):219-27) supplémenté avec du FCS 10 % (Roche, Meylan, France) et 2×10^{-5} M de β_2 -ME (Invitrogen, San Diego, CA). Les interleukines IL-4 et IL-10 recombinantes de souris ont été données par le docteur R.L. Coffman (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA). L'interféron IFN- γ et l'IL-12 de souris recombinants ont été achetés chez R&D Systems (Minneapolis, MN). Les anticorps purifiés anti-IL-4 (11B11), anti-IL-10 (2A5), anti-IFN- γ (XGM1.2), et biotine-anti-IL-4 (24G2), -anti-IL-10 (SXC1) et -anti-IFN- γ (R4-6A2), tous de BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France) ont été utilisés pour les tests de cytokines. Les anticorps monoclonaux (mAb) (Becton Dickinson, Le Pont de Claix - FR) suivants ont été utilisés pour la détection et la purification des cellules de souris : notamment, l'anticorps anti-CD4 conjugué à la phycoérythrine (PE-conjugué) (GK1.5), l'anticorps anti-CD25 conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-conjugué) (7D4), l'anticorps monoclonal KJ-1.26 biotinylé ou FITC-conjugué révélé par de la streptavidine PE-marquée, et les anticorps de contrôle d'isotype FITC-conjugués ou PE-conjugués.

Le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ et l'oxazolone ont été fournis par Sigma-Chemie (Saint Quentin-Fallavier, France). Le lipopeptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ a été acheté chez Bachem (Voisin-le-Bretonneux, France).

Populations de cellules T et clones de cellules T

Les clones de cellules T de souris ont été obtenus à partir de souris DO11-10 après différenciation *in vitro* comme il a déjà été décrit (Nature. 1997 Oct 16;389(6652):737-42). Les cellules CD4⁺ (MEL-14^{bright}) et KJ-1.26⁺ naives ont été stimulées pendant 3 semaines de manière répétitive avec le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ en présence d'IL-4 et d'anti-IL-12, d'IL-12 et d'anti-IL-4, ou d'IL-10 pour les cellules Th2, Th1 ou Tr1, respectivement. Les populations obtenues sont soit utilisées *in vivo* soit clonées à une cellule par puits par cytofluorométrie (FACSVantage SE ; BD Biosciences) et stimulées avec des splénocytes irradiés (4500 rad) et le peptide OVA. Les clones ont ensuite été développés et analysés pour leur sécrétion de cytokines après activation avec les peptides APCs et OVA (voir Tableau I des profils de cytokines des

différentes cellules T utilisées : les cellules T (10^6 cellules/ml) ont été stimulées avec le peptide OVA ($0,6 \mu\text{M}$) et des splénocytes totaux irradiés (2×10^6 cellules/ml). Les cytokines ont été analysées par ELISA dans des surnageants de culture collectés après 48 heures de culture. Pour les différents clones de cellules T les résultats représentent le moyen \pm SD de trois expériences représentatives de stimulation. Pour les populations de cellules T, les résultats représentent le moyen \pm SD de mesures en triplicate de deux expériences représentatives). Les clones sélectionnés ont été développés par stimulation avec des splénocytes irradiés et le peptide OVA toutes les deux semaines et ont ensuite été développés avec de l'IL-2 (R&D Systems ; 10ng/ml). Les clones de cellules T ont été utilisés au moins 10 jours après la dernière stimulation.

Nom	Type	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (ng/ml)
A-10-9	Tr1	<40	<50	1874 ± 217	65 ± 9
A-10-11	Tr1	<40	<50	1595 ± 184	42 ± 4
Nice-1	Tr1	<40	<50	1936 ± 502	38 ± 12
Nice-2	Tr1	<40	<50	1273 ± 298	51 ± 9
N10-7	Tr1	<40	<50	1659 ± 432	37 ± 7
N10-11	Tr1	<40	<50	1804 ± 394	41 ± 5
N10-23	Tr1	<40	<50	1493 ± 276	13 ± 3
N12-4	Th1	219 ± 42	<50	<75	73 ± 13
N12-8	Th1	275 ± 31	<50	<75	97 ± 10
N12-13	Th1	196 ± 54	<50	<75	84 ± 17
N4-2	Th2	<40	912 ± 81	305 ± 49	<0.2
N4-9	Th2	<40	1065 ± 103	287 ± 36	<0.2
N4-12	Th2	<40	715 ± 59	412 ± 67	<0.2
	Pop.Tr1	<20	112 ± 19	12865 ± 1457	5 ± 0.1
	Pop.Tr1	<20	86 ± 21	14945 ± 1065	2.8 ± 0.2
	Pop.Th1	513 ± 106	<40	<75	156 ± 4
	Pop.Th1	313 ± 95	<40	<75	124 ± 15
	Pop.Tr2	<20	2321 ± 769	6378 ± 834	<0.2
	Pop.Tr2	<20	998 ± 143	5241 ± 984	<0.2

Tableau I

15 Sensibilité au contact de l'Oxazolone

La sensibilité au contact de l'Oxazolone a été réalisée en appliquant $20 \mu\text{l}$ d'une solution de 50mg/ml d'Oxazolone dans un mélange acétone/huile d'olive (4:1, vol : vol) en épicutané sur l'oreille droite une fois par jour durant trois jours. L'oreille gauche a reçu

uniquement le véhicule. L'épaisseur de l'oreille a été enregistrée chaque jour. L'OVA₃₂₃₋₃₃₉-lipopeptide a été dilué à 50 μ M dans de l'huile d'olive. Les souris ont été traitées pendant 6 jours en appliquant chaque jour 20 μ l de 50 μ M d'OVA₃₂₃₋₃₃₉-lipopeptide ou d'huile d'olive directement sur l'oreille inflammée.

5

Exemple 2 : Les lymphocytes Tr1 exercent un effet anti-inflammatoire sur les irritations de la peau

Les inventeurs ont effectué des expériences d'inflammation de la peau en utilisant l'haptène oxazolone dans trois applications journalières (Fig. 1). Les inventeurs ont d'abord testé la capacité d'une application cutanée de lipo-OVApeptide à stimuler les cellules T. Des cellules T DO11-10 OVA-spécifiques naïves ont été injectées à des souris BALB/c et les souris ont été traitées pendant 6 jours en appliquant chaque jour 20 μ l de 50 μ M d'OVA₃₂₃₋₃₃₉-lipopeptide ou d'huile d'olive directement sur l'oreille. L'analyse des cellules T dans les ganglions lymphatiques de drainage a révélé une accumulation de cellules (CD25⁺) OVA-spécifiques (KJ1-26⁺) activées uniquement au niveau des ganglions lymphatiques de drainage de l'oreille traitée avec le lipopeptide (Fig. 1). Dans ce modèle, trois jours après l'induction de l'inflammation de l'oreille avec l'oxazolone, les souris ont été traitées avec des populations de cellules T Th1, Th2 ou Tr1 OVA-spécifiques ou avec un clone de cellules Tr1 (Fig 2) et le lipo-OVA peptide a été appliqué pendant 6 jours. Chez les souris traitées avec des cellules Tr1, une diminution marquée des signes inflammatoires a été observée alors que le traitement avec les cellules Th1 ou Th2 a fait accroître l'inflammation et l'oedème (Fig 2).

25

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un lipopeptide ou d'un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide
5 comprenant un antigène peptidique couplé de manière covalente à un radical
lipidique pour la fabrication d'un médicament topique destiné à activer les
lymphocytes T, ledit antigène étant spécifique des lymphocytes T.

*(Il est nécessaire de définir l'antigène peptidique spécifique des lymphocytes
10 T ????????)*
2. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 1, caractérisée en ce que le
radical lipidique du lipopeptide est dérivé d'un acide gras.
- 15 3. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que
l'acide gras est l'acide palmitique.
4. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en
ce que le médicament topique comprend en outre un support
20 pharmaceutiquement acceptable.
5. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en
ce que le médicament topique convient pour une application transcutanée.
- 25 6. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en
ce que l'activation des lymphocytes T est destinée à prévenir ou à traiter une
maladie de la peau.
7. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en
30 ce que la maladie de la peau est choisie dans le groupe du psoriasis, du vitiligo,
du prurigo, du pityriasis, de la mastocytose cutanée éruptive, des

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'un lipopeptide ou d'un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique couplé de manière covalente à un radical lipidique pour la fabrication d'un médicament topique destiné à activer les lymphocytes T, ledit antigène étant spécifique des lymphocytes T.
- 10 2. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 1, caractérisée en ce que le radical lipidique du lipopeptide est dérivé d'un acide gras.
3. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'acide gras est l'acide palmitique.
- 15 4. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le médicament topique comprend en outre un support pharmaceutiquement acceptable.
- 20 5. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le médicament topique convient pour une application transcutanée.
- 25 6. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'activation des lymphocytes T est destinée à prévenir ou à traiter une maladie de la peau.
- 30 7. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la maladie de la peau est choisie dans le groupe du psoriasis, du vitiligo, du prurigo, du pityriasis, de la mastocytose cutanée éruptive, des sclérodermies, des dermatoses bulleuses, des emphysèmes cutanés, de l'eczéma, de l'acnée, d'un œdème ou du rejet de greffe.

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'un lipopeptide ou d'un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique spécifique des lymphocytes T, ledit antigène étant couplé de manière covalente à un radical lipidique et étant capable d'activer les lymphocytes T, pour la fabrication d'un médicament topique destiné à prévenir ou à traiter une maladie de la peau.
- 10 2. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 1, caractérisée en ce que, lorsque les lymphocytes T sont des lymphocytes T régulateurs, le médicament topique est destiné à prévenir ou à traiter des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau.
- 15 3. Utilisation d'un lipopeptide ou d'un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique spécifique des lymphocytes T régulateurs, ledit antigène étant couplé de manière covalente à un radical lipidique et étant capable d'activer les lymphocytes T régulateurs, pour la fabrication d'un médicament topique pour la prévention ou le traitement des réactions ou
- 20 pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires des muqueuses.
4. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le radical lipidique du lipopeptide est dérivé d'un acide gras.
- 25 5. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'acide gras est l'acide palmitique.
- 30 6. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le médicament topique comprend en outre un support pharmaceutiquement acceptable.

sclérodermies, des dermatoses bulleuses, des emphyèmes cutanés, de l'eczéma, de l'acnée, d'un œdème ou du rejet de greffe.

- 5 8. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les lymphocytes T activés sont des lymphocytes T régulateurs.
9. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 8 pour la prévention ou le traitement des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau et/ou des muqueuses.
- 10 10. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné à être administré au niveau du site de l'inflammation.
- 15 11. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné au traitement des maladies auto-immunes ou des maladies inflammatoires chroniques.
- 20 12. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisée en ce que le médicament topique se présente sous forme de gel, d'émulsion, de crème, de pommade, de lait, d'huile, de lotion, d'aérospray, de patch ou de collyre.
- 25 13. Composition pharmaceutique comprenant le lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3 et un support pharmaceutiquement acceptable pour diminuer une réaction inflammatoire locale.
- 30 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que la réaction inflammatoire locale est une réaction inflammatoire locale cutanée résultant d'une agression extérieure telle que notamment une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, une greffe, ou due à un allergène ou à un microbe.

8. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les lymphocytes T activés sont des lymphocytes T régulateurs.
- 5 9. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 8 pour la prévention ou le traitement des réactions ou pathologies allergiques, inflammatoires, immunitaires de la peau et/ou des muqueuses.
- 10 10. Utilisation du lipopeptide selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné à être administré au niveau du site de l'inflammation.
- 15 11. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné au traitement des maladies auto-immunes ou des maladies inflammatoires chroniques.
- 20 12. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisée en ce que le médicament topique se présente sous forme de gel, d'émulsion, de crème, de pommade, de lait, d'huile, de lotion, d'aérospray, de patch ou de collyre.
- 25 13. Composition pharmaceutique comprenant le lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3 et un support pharmaceutiquement acceptable pour diminuer une réaction inflammatoire locale.
- 30 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que la réaction inflammatoire locale est une réaction inflammatoire locale cutanée résultant d'une agression extérieure telle que notamment une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, une greffe, ou due à un allergène ou à un microbe.
15. Composition cosmétique comprenant le lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3 et un support cosmétiquement acceptable pour prévenir

7. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1, 2, 4, 5 ou 6, caractérisée en ce que la maladie de la peau est choisie dans le groupe du psoriasis, du vitiligo, du prurigo, du pityriasis, de la mastocytose cutanée éruptive, des sclérodermies, des dermatoses bulleuses, des emphysèmes cutanés, de l'eczéma, de l'acnée, d'un œdème ou du rejet de greffe.

5
8. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné à être administré au niveau du site de l'inflammation.

10
9. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que le médicament topique est destiné au traitement des maladies auto-immunes ou des maladies inflammatoires chroniques.
- 15 10. Utilisation du lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le médicament topique se présente sous forme de gel, d'émulsion, de crème, de pommade, de lait, d'huile, de lotion, d'aérospray, de patch ou de collyre.
- 20 11. Composition pharmaceutique comprenant le lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 5 et un support pharmaceutiquement acceptable pour diminuer une réaction inflammatoire locale.
- 25 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la réaction inflammatoire locale est une réaction inflammatoire locale cutanée résultant d'une agression extérieure telle que notamment une brûlure, un rayonnement, une coupure, une piqûre, une greffe, ou due à un allergène ou à un microbe.
- 30 13. Composition cosmétique comprenant un lipopeptide ou un mélange de lipopeptides, ledit lipopeptide comprenant un antigène peptidique spécifique des lymphocytes T, ledit antigène étant couplé de manière covalente à un

15. Composition cosmétique comprenant le lipopeptide selon l'une des revendications 1 à 3 et un support cosmétiquement acceptable pour prévenir ou traiter des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.

ou traiter des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.

radical lipidique et étant capable d'activer les lymphocytes T, et un support cosmétiquement acceptable, pour prévenir ou traiter des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.

- 5 14. Composition cosmétique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le radical lipidique du lipopeptide est dérivé d'un acide gras.
15. Composition cosmétique selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'acide gras est l'acide palmitique.

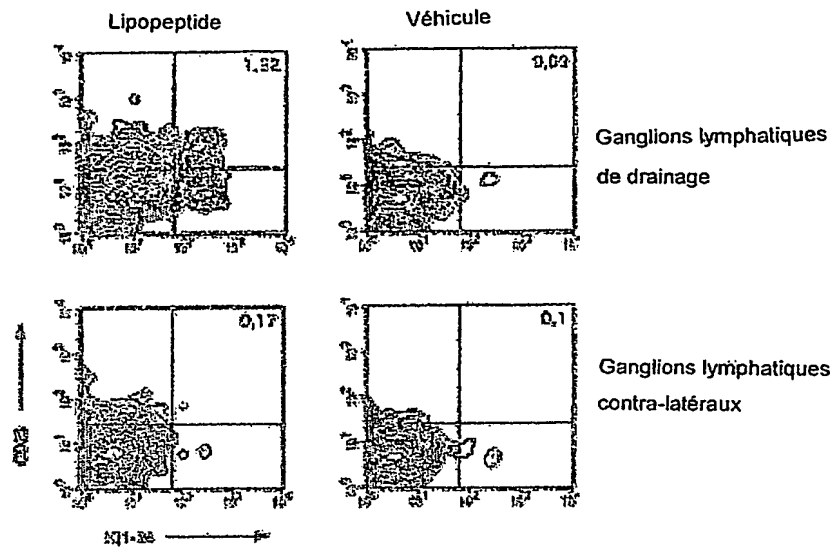


Figure 1

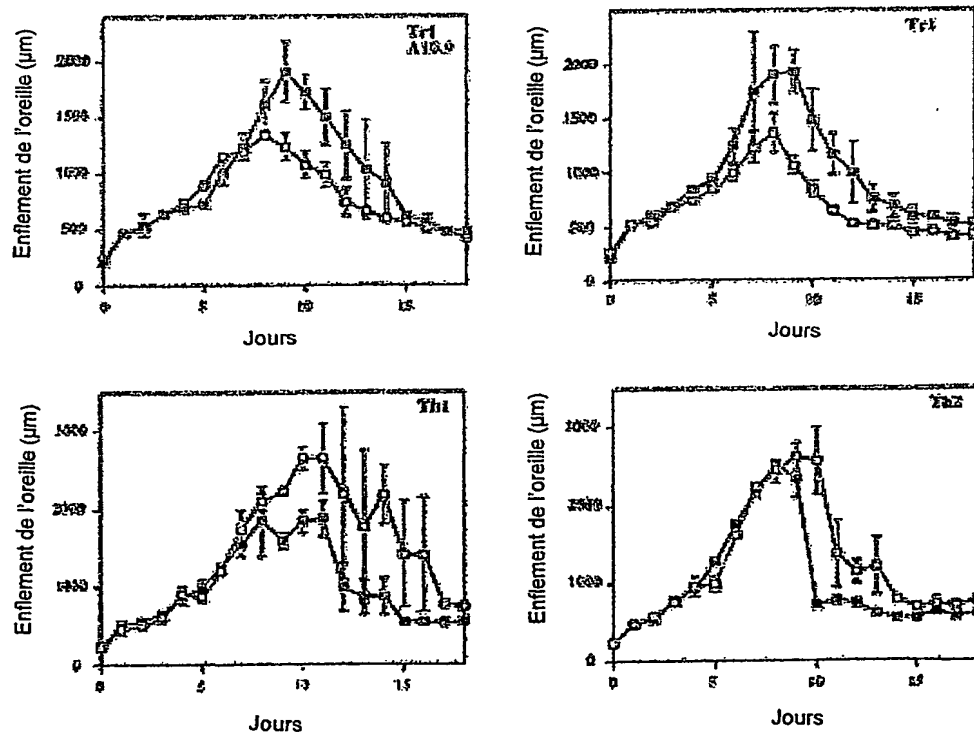


Figure 2

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1. / .1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 300301

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240280 D20884 SDE
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0313261
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DE LIPOPEPTIDES POUR ACTIVER DES LYMPHOCYTES T A TRAVERS LA PEAU		
LE(S) DEMANDEUR(S) : TXCELL : route de Saint Antoine de Ginestière, Bâtiment Arc Hôpital de l'Archet, 06200 NICE - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		GROUX
Prénoms		Hervé
Adresse	Rue	27, Avenue des Colibris
	Code postal et ville	06141 BIOT - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 92-1234 Christian TEXIER

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.